



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
MEDICINA

**Evolución en la expresión de CADM1 y CD7 en
linfocitos T CD4+ de pacientes con HTLV-1 que
reciben tratamiento antiparasitario para infección
activa por *Strongyloides stercoralis***

Evolution of CADM1 and CD7 expression in CD4+ T-lymphocytes
of HTLV-1 patients receiving antihelminth therapy for active
Strongyloides stercoralis co-infection

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR POR EL
TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO CIRUJANO

ALUMNO

Sebastián Echeandía Rushton

ASESOR

Martin Montes Delgado

COASESORA

Elsa González Lagos

LIMA - PERÚ

2022

JURADO

Presidenta: Dra. Coralith García Apac

Vocal: Dr. Carlos Seas Ramos

Secretaria: Dra. Dalila Martínez Medina

Fecha de Sustentación: 16 de marzo del 2022

Calificación:

ASESORES DE TESIS

ASESOR

Dr. Martín Montes Delgado

Departamento Académico de Medicina

ORCID: 0000-0002-7427-347X

CO-ASESORA

Dra. Elsa González Lagos

Departamento Académico de Medicina

ORCID: 0000-0002-8543-8188

DEDICATORIA

A mis padres, maestros y futuros pacientes.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, por la motivación y apoyo constante.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

El presente estudio ha sido autofinanciado. El estudio que generó la base de datos para el proyecto actual obtuvo financiamiento de: Grant IRID (International Research in Infetious Diseases) del NIH. Donación anticuerpo CADM1: Dr. Kazuhiro Morishita, director del HTLV-1/ATL Research, Universidad de Miyasaki. Fondos del Laboratorio de Inmunología – IMT-AvH

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

El autor declara no tener conflictos de interés.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
I. Introducción	1
II. Objetivos	4
III. Materiales y métodos	5
IV. Resultados	9
V. Discusión	12
VI. Conclusiones	17
VII. Referencias bibliográficas	18
VIII. Tablas, gráficos y figuras	22

RESUMEN

Antecedentes: aproximadamente 1% de la población peruana vive con la infección por HTLV-1; de ellos, 3-5% podría desarrollar leucemia/linfoma de células T del adulto (ATLL). La coinfección con estrongiloidiasis podría asociarse al desarrollo precoz de ATLL. Los linfocitos T CD4+ infectados con HTLV-1 expresan el marcador CADM1. En esa población celular, la menor expresión de CD7 podría indicar progresión a ATLL. **Objetivo:** En pacientes coinfectados con HTLV-1 y estrongiloidiasis, caracterizar, mediante citometría de flujo, la proporción de linfocitos T CD4+ que expresan CADM1 y no expresan CD7, medido al momento del diagnóstico de estrongiloidiasis, a las 2 y 4 semanas de iniciado el tratamiento antihelmíntico. **Materiales y métodos:** estudio observacional descriptivo con uso de datos secundarios. El análisis de citometría se realizó con el software FlowJo v10 en muestras de cinco sujetos con episodios no severos de estrongiloidiasis. Se compararon las proporciones mediante Stata v17. **Resultados:** la mediana del porcentaje de linfocitos T CD4 CADM1+/CD7- basal fue: 2,24%; al final del seguimiento, 4,40%, sin variación significativa entre ambas. Entre la segunda y tercera visita, se observó una estabilización en la proporción de linfocitos T CD4 CADM1+/CD7- (mediana de variación 0,5%, $p=0,26$). **Conclusiones:** en este estudio piloto, en pacientes coinfectados con HTLV-1 y estrongiloidiasis no severa, observamos una tendencia a la disminución en la proporción de linfocitos T CD4 CADM1+/CD7- tras iniciar tratamiento antiparasitario. Aunque se requiere ampliar el estudio a formas severas de estrongiloidiasis, este hallazgo no sugiere la expansión monoclonal inmediata que podría incrementar el riesgo de ATLL.

Palabras claves: *Strongyloides stercoralis*. HTLV-1. ATLL, Perú. (DeCS)

ABSTRACT

Background: around 1% of the Peruvian population lives with HTLV-1 infection. Of those infected, 3-5% could develop adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). *Strongyloides stercoralis* co-infection has been associated with earlier ATLL onset. HTLV-1 infected CD4+ T cells express the surface marker CADM1. It is hypothesized that downregulation of CD7 is an indicator of ATLL progression in infected cells.

Objective: to characterize, based on flow cytometry analysis, the proportion of CD4+ T cells that are CADM1+ and CD7- at diagnosis and at 2 and 4 weeks after initial antihelminth treatment in patients coinfecting with HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*.

Materials and methods: descriptive study using a secondary database. Flow cytometry results were analyzed using FlowJo (v10). For statistical analysis Stata (v17) was used.

Results: the median of the proportion of CADM1+/CD7- CD4 T cells was 2.24% at the first visit and 4.40% at the last visit. No significant variation was observed between them. There was a trend towards stabilization in the proportion of CADM1+/CD7- CD4 T cells between the second and third visits (median 0,5%, $p = 0,26$).

Conclusions: in this pilot study we observed a trend towards a reduction in the CADM1+/CD7- CD4 T cell population after starting antiparasitic treatment in patients coinfecting with HTLV-1 and nonsevere strongyloidiasis. Even though further evaluation is needed in patients with severe strongyloidiasis, this finding suggests that there is no immediate monoclonal expansion that could increase the risk of ATLL.

Keywords: *Strongyloides stercoralis*. HTLV-1. ATLL, Perú.

I. INTRODUCCIÓN

El virus linfotrópico de células T humanas tipo I (HTLV-1) infecta a 10-20 millones de personas en el mundo y es endémico en Perú, donde la prevalencia es de 1-7% (1). Puede ser transmitido por vía sexual, sanguínea, o lactancia materna, siendo este último el principal mecanismo (2). El virus infecta selectivamente a los linfocitos T CD4+ integra su ADN al del huésped y estimula su proliferación incontrolada (3). Cerca del 5% de pacientes con HTLV-1 desarrolla leucemia/linfoma de células T del adulto (ATLL) a lo largo de su vida (4, 5).

Strongyloides stercoralis (SS) es un geohelminto que predomina en zonas tropicales y subtropicales, muchas veces coincidiendo con las zonas donde HTLV-1 es prevalente (6). Factores de riesgo para hiperinfección incluyen infección por HTLV-1 y tratamiento con corticoides, esto se asocia a la capacidad de autoinfección de SS (7-10). Montes et al describió que la coinfección de HTLV-1 con SS se asocia a una mayor carga parasitaria y menor respuesta inmune mediada por eosinófilos vía la interleucina-5 (11).

Un reciente metaanálisis de Ye et al (12) describió un OR 3.2 para la infección por SS en pacientes con HTLV-1, en comparación con pacientes sin HTLV-1. Además, encontraron una fuerte asociación (OR 59.9) entre estrongiloidiasis severa y HTLV-1, así como mayor riesgo de falla al tratamiento antiparasitario (OR 5.05).

La relación entre SS y HTLV-1 es bidireccional. HTLV-1 favorece una mayor severidad de infección por SS ya que reduce la inmunidad celular de tipo Th2 y aumenta la población de linfocitos T reguladores (11, 13). Por otro lado, se ha descrito que SS puede acelerar el desarrollo de ATLL en pacientes con HTLV-1.

Plumelle et al notó una edad media de diagnóstico de ATLL de 39 años en pacientes coinfectados comparado con una media de 70 años en pacientes sin SS (14).

El mecanismo de oncogénesis de HTLV-1 no es del todo conocido. Parece ser que el principal factor de riesgo es la carga proviral, que es menor en pacientes asintomáticos, intermedia en pacientes coinfectados con SS y más alta en pacientes con ATLL (15).

Uno de los principales problemas en la investigación del HTLV-1 ha sido identificar, mediante citometría de flujo, a las células infectadas con el virus. Recientemente se ha descrito que la proteína de superficie CADM1 puede identificar a más del 60% de células infectadas, permitiendo por tanto conocer indirectamente la magnitud de la carga viral (16, 17). La molécula de superficie CD7 normalmente se expresa en los linfocitos T, pero su expresión disminuye o es nula durante el inicio de la transformación celular, por lo que permite ser usada como un marcador de progresión a ATLL. Además, se demostró que una expresión disminuida o nula de CD7 se correlaciona con la integración monoclonal del ADN viral (18). Por tanto, el fenotipo combinado de CADM1+ y CD7- puede ser usado para identificar la transformación temprana de células infectadas con HTLV-1.

Se ha descrito que pacientes con HTLV-1 y SS tienen menor respuesta al tratamiento antiparasitario con ivermectina en comparación con pacientes sin HTLV-1 (12, 19). Si bien se ha demostrado que una sola dosis de ivermectina es igual de eficaz que cuatro dosis en pacientes sin HTLV-1 (20), en pacientes coinfectados no hay estudios al respecto. Por tanto, la literatura sugiere un esquema de cuatro dosis de ivermectina (2 dosis de 200ug/kg cada una, separadas 24h,

seguido de otras 2 dosis a los 14 días) para evitar el riesgo de falla al tratamiento.

La lógica de repetir el tratamiento a los 14 días consiste en que coincide con la duración del ciclo de autoinfección de SS, y la ivermectina solo elimina a los parásitos adultos localizados en el intestino.

Proponemos estudiar la proporción de linfocitos T con fenotipo CADM1+/CD7- en pacientes con HTLV-1 coinfectados con SS antes del tratamiento y a las 2 y 4 semanas de la primera visita.

II. OBJETIVO

En pacientes coinfectados con HTLV-1 y estrongiloidiasis, caracterizar, mediante citometría de flujo, la proporción de linfocitos T CD4+ que expresan CADM1 y no expresan CD7, medido al momento del diagnóstico de estrongiloidiasis, a las 2 y a las 4 semanas del iniciado el tratamiento antihelmíntico.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

El proyecto de investigación corresponde a un estudio observacional descriptivo.

Población

Base de datos del estudio “El efecto de *Strongyloides stercoralis* en la progresión de la infección por HTLV-1” con código SIDISI 101272, cuyos autores principales son los asesores de este proyecto de tesis. Los criterios de inclusión de dicho estudio son: edad entre 18 y 65 años, serología y Western Blot positivos para HTLV-1 y firma de consentimiento informado aprobado por el CIE. Para contactar a los sujetos en dicho estudio, se utilizó la base de datos de la cohorte de HTLV-1 del Instituto de Medicina Tropical ‘Alexander von Humboldt’ de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (IMT-UPCH). Con el uso de dicha base de datos, se contactó vía telefónica a los pacientes con diagnóstico previo de HTLV-1 para una toma de muestra de heces (test de Baerman y agar placa), muestra de sangre y revisión de síntomas actuales. En los casos donde los familiares del paciente no habían sido evaluados para HTLV-1, se les ofrecía la prueba. Además, los pacientes con HTLV-1 o estrongiloidiasis activa que acudían al consultorio del IMT-UPCH eran referidos para enrolarse en el estudio. El total de sujetos enrolados al realizar este estudio era de 128 (Gráfico 1).

Muestra

Los criterios utilizados para seleccionar la muestra a partir de la población descrita fueron: infección activa por *Strongyloides stercoralis* (test de Baermann o agar placa positivo), serología y Western Blot positivos para HTLV-1 y contar con

análisis de citometría de flujo de células mononucleares de sangre periférica con respecto a la expresión de CD3, CD4, CD7 y CADM1 en al menos tres visitas. Como criterio de exclusión los sujetos no podían tener enfermedades severas asociadas a la infección por HTLV-1, es decir, leucemia/linfoma de células T del adulto o paraparesia espástica tropical. Del total de sujetos registrados en la base de datos, 20 tenían HTLV-1 e infección activa por *Strongyloides stercoralis*. De esos 20, 6 contaban con análisis por citometría de flujo. Uno de los 6 sujetos tenía diagnóstico previo de paraparesia espástica tropical, por lo que fue excluido del análisis. Por tanto, la muestra final de este estudio consistió en 5 pacientes con HTLV-1 y estrongiloidiasis activa.

Definición operacional de variables:

Todas las variables se registraron de forma digital.

Infección por HTLV-1: Enzimoimmunoanálisis positivo para HTLV-1, confirmado por Western Blot. Escala de medición nominal dicotómica.

Caso de estrongiloidiasis activa: Test de Baermann modificado en copa por Lumbreras o cultivo de heces en agar en placa positivo para *Strongyloides stercoralis*. Escala de medición nominal dicotómica.

Falla al tratamiento: Presencia de *Strongyloides stercoralis* en heces en cualquier muestra del seguimiento luego de la última dosis de tratamiento antiparasitario.

Linfocito T CD4+: Células periféricas mononucleares que expresan CD3 y CD4. Escala de medición de razón.

Población CADM1+/CD7-: Proporción de linfocitos T CD4+ que expresan CADM1 y no expresan CD7. Escala de medición de razón.

Procedimientos y Técnicas

Los resultados de citometría de flujo se analizaron con el software FlowJo (v10) sin que el operador conozca el código de los sujetos. Se repitió el análisis con otro operador, arrojando resultados similares. Toda la información se encontraba registrada de forma cruda en la base de datos del estudio mencionado. Los análisis realizados se encuentran en las computadoras del IMT-UCPH. No se realizó mayor análisis de las muestras de sangre de los pacientes.

El proceso para obtener las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se basó en protocolos uniformizados con la data preliminar en el mismo laboratorio de inmunología (ver Anexo). Brevemente, los 15ml de sangre del paciente se procesaban para obtener PBMCs. Luego, un número determinado de PBMCs se incubaba con anticuerpos marcados con fluorocromos para posteriormente analizarlo en el citómetro de flujo (FACScalibur, BD, San Jose, CA-USA). Los PBMCs que no eran incubados se criopreservaban en nitrógeno líquido para un posterior análisis.

Aspectos éticos del estudio

El protocolo de estudio fue presentado y aprobado por el Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Los nombres de los participantes no están incluidos en alguna base de datos y el intercambio de información entre los protocolos de estudio y los análisis se realizó mediante información codificada. Toda la información obtenida fue trabajada en las computadoras del IMT-UPCH, al cual solo se puede acceder usando los códigos personales de los investigadores. Al ser un subestudio del citado anteriormente

(SIDISI 101272) el consentimiento informado ya había sido firmado por el paciente al momento del reclutamiento.

Plan de análisis

Para el análisis estadístico, los datos sin identificadores personales fueron exportados a Stata versión 17 (licencia IMT-UPCH). Las variables categóricas fueron descritas con porcentajes y frecuencias. Las variables continuas fueron descritas con medidas de tendencia central y de dispersión de acuerdo a distribución no normal (medianas y rangos intercuartiles). En el análisis bivariado, se comparó la proporción de linfocitos T CD4+ que eran CADM1+ CD7- entre el basal y con respecto a las 2 y 4 semanas posterior a la primera visita. Para comparar la variación en dicha proporción entre la visita inicial y a las 2 semanas y entre las 2 y 4 semanas se realizó la prueba de Wilcoxon. Para comparar la variación entre la visita basal y las 2 y 4 semanas se realizó la prueba de Kruskal-Wallis. Todos los análisis fueron realizados con un nivel de significancia estadística $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

Datos demográficos

La mediana de edad de los sujetos fue 43 años (rango 26-52), siendo 4 de sexo masculino. Tres sujetos tenían antecedente de solo un caso de estrongiloidiasis, un sujeto tenía antecedente de dos episodios previos de estrongiloidiasis. En cuanto a antecedentes personales, un sujeto tenía anemia ferropénica moderada con tratamiento exitoso y otro sujeto, trastorno depresivo mayor. Cuatro de 5 sujetos provenían de departamentos de la Sierra. La mediana de tiempo del diagnóstico de HTLV-1 fue 6 años (Tabla 1).

Síntomas al momento del enrolamiento

Los síntomas que presentaban los sujetos al momento del enrolamiento son descritos en la Tabla 2, así como el resultado de Baermann en heces o agar placa y el motivo del examen parasitológico. Dos sujetos fueron enrolados al ser referidos por el consultorio externo de tropicales debido a la presencia de síntomas gastrointestinales. Tres sujetos fueron enrolados luego de contactarlos como parte del seguimiento de la cohorte de HTLV-1 del IMT-UCPH. De los 2 sujetos referidos por consultorio externo, uno presentaba distensión abdominal y prurito generalizado, además de un test de Baermann en heces con más de 100 larvas por gramo de muestra. El otro, a pesar de tener síntomas, tuvo un test de Baerman negativo, sin embargo el agar placa fue positivo. De los 3 sujetos que fueron contactados por la cohorte, uno era asintomático y los otros 2 tenían dolor abdominal leve. Los 3 tuvieron test de Baermann positivo, con una mediana de 14 larvas por gramo de muestra.

Hemograma y examen de heces en la visitas 2 y 3

Los hemogramas de la primera visita previo al tratamiento son presentados en la Tabla 3. Ningún sujeto presentaba eosinofilia (definida como > 500 eosinófilos/ul). En la visita de la segunda semana (visita 2), el examen de heces (Baermann y agar placa) fue negativo en todos los sujetos, excepto en uno, que tuvo 1 larva / gramo, en dicha visita se realizó la segunda toma de tratamiento antiparasitario en todos los sujetos según estaba indicado, independiente del resultado de heces. En la visita de la cuarta semana (visita 3) todos los sujetos tuvieron examen de heces negativo.

Citometría de flujo

Los resultados de citometrías de flujo con respecto al porcentaje de linfocitos T CADM1+ y CADM1+/CD7- son presentados en las tablas 4 y 5, respectivamente. La gráfica de dichas tendencias son presentadas en los gráficos 2 y 3. En cuanto al análisis estadístico de los resultados de citometría de flujo no hubo variación significativa ($p > 0,05$) en el conteo absoluto y porcentaje de linfocitos T CADM1+ o CADM1+/CD7- entre las visitas 1 a 3 (Kruskal-Wallis). Se encontró un aumento no significativo con una mediana de 1,79% en la población de linfocitos CADM1+/CD7- ($p = 0,22$) a las 2 semanas de la primera dosis de ivermectina (visita 2; Wilcoxon). Hubo una estabilización o reducción en la población de linfocitos CADM1+/CD7- (mediana 0,5%, $p = 0,26$) a las 2 semanas luego de la segunda dosis de ivermectina (visita 3; Wilcoxon).

A modo de comparación se obtuvo un gráfico de citometría previo (CADM1 vs CD7 dentro de la población de linfocitos T) de un paciente con HTLV-1 sin infección actual ni antecedente de estrongiloidiasis (Imagen 1A) y se comparó con

uno de los pacientes del presente estudio al momento del diagnóstico de estrombiloidiasis (Imagen 1B). El porcentaje de linfocitos T CADM1+ en el primer paciente fue de 8.11%, y en el segundo fue de 22.07%.

V. DISCUSIÓN

La expresión de CADM1+ y CADM1+/CD7- en pacientes coinfectados con HTLV-1 muestra una tendencia al aumento luego de 2 semanas del primer régimen de ivermectina, y una tendencia a la disminución o estabilización a las 2 semanas del segundo régimen de ivermectina. Una de las razones por lo cual dicha tendencia no sería estadísticamente significativa es el bajo número muestral (baja potencia), así como una diferencia menor a la esperada en el cambio del porcentaje de las poblaciones de linfocitos T luego del tratamiento. El aumento inicial de las poblaciones de linfocitos T CADM1+ y CADM1+/CD7- a las 2 semanas podría explicarse fisiopatológicamente por una mayor destrucción del parásito, lo que liberaría al medio una gran cantidad de antígenos, favoreciendo la proliferación inicial de los linfocitos T. La tendencia a la disminución o estabilización de dichas poblaciones de linfocitos T podría explicarse por la ausencia del antígeno parasitario a las 2 semanas luego del segundo régimen de ivermectina. Dicha tendencia a la disminución o estabilización podría acentuarse más a lo largo del tiempo, siempre y cuando los pacientes no vuelvan a presentar un cuadro de estrongiloidiasis. Estudios con mayor número muestral podrían demostrar una significancia estadística en dicha tendencia, más aún con seguimiento a largo plazo. Posterior a eso, debe evaluarse si dicha tendencia correlaciona con un menor riesgo de desarrollar ATLL. Para eso se debe realizar un seguimiento de varios años debido al periodo de latencia prolongado que presenta el desarrollo de ATLL. En caso se demuestre lo anterior, el tratamiento temprano y/o monitoreo para la

infección por *Strongyloides stercoralis* en pacientes con HTLV-1 podría ser útil para la prevención primaria de ATLL.

Un estudio prospectivo realizado por Makiyama et al (21) separó las poblaciones de linfocitos T de pacientes con HTLV-1, sin estrongiloidiasis, en dos grupos, los que tenían < 25% de expresión de CADM1 y los que tenían > 25%. En el seguimiento a largo plazo se observó una mayor incidencia de desarrollo de ATLL en el segundo grupo. En el caso de los sujetos de este estudio, todos corresponderían al primer grupo descrito, por lo que teóricamente no tendrían un riesgo elevado de desarrollar ATLL. Sin embargo, a diferencia del estudio citado, los sujetos de este estudio tenían estrongiloidiasis activa, por lo que el riesgo de ATLL podría ser mayor, a pesar de tener una población de linfocitos T que expresan CADM1 menor al 25% del total. Es por eso que resulta fundamental el seguimiento a largo plazo de pacientes con antecedente de estrongiloidiasis.

Es importante mencionar que la infección por *Strongyloides stercoralis* puede comportarse como una infección crónica en pacientes con HTLV-1 (22), por lo que cuantificar el número de episodios previos de estrongiloidiasis podría ser un sesgo. En los cinco sujetos el régimen de ivermectina fue exitoso y hasta los 12 meses de seguimiento no han presentado examen de heces positivo para *Strongyloides stercoralis* (en Baermann y agar placa). Se debe también evaluar el efecto de la falla al tratamiento antiparasitario con el riesgo de desarrollo futuro de ATLL, y si la detección precoz de la falla al tratamiento y el manejo adecuado evitaría el aumento de riesgo de desarrollar dicha neoplasia.

De los 5 sujetos, 4 son varones, lo cual podría indicar un mayor riesgo de infección por *Strongyloides stercoralis* en el sexo masculino. Esto podría explicarse por la exposición laboral, ya que el parásito infecta al humano mediante penetración cutánea en tierra contaminada. La mayoría de sujetos nacieron en la región andina, lo que corresponde con la mayor prevalencia de HTLV-1 en dicha zona. Si bien se desconoce el status HTLV-1 de los padres de los sujetos, el mecanismo más probable de transmisión sería vía lactancia materna. El sujeto 1 presentó más de 100 larvas por gramo en el test de Baermann y fue quien tenía los síntomas más llamativos, incluyendo prurito generalizado. Dicho prurito podría estar relacionado con la elevada carga parasitaria (23). Uno de los sujetos que acudió con epigastralgia y náuseas tuvo un test de Baermann negativo, sin embargo, el agar placa, que tiene mayor sensibilidad, fue positivo. En pacientes con HTLV-1 y síntomas gastrointestinales, un test de Baermann negativo no debería ser utilizado como única prueba para descartar estrongiloidiasis. Otro aspecto importante es que en dos sujetos se realizó el diagnóstico de estrongiloidiasis sin que ellos acudan por decisión propia a consultorio. Es decir, si bien tenían síntomas leves, no eran lo suficientemente severos como para que acudan a un médico. Sin embargo, tenían infección activa por *Strongyloides stercoralis*. Esto resalta la importancia de educar a los pacientes con HTLV-1 la importancia de reconocer los posibles síntomas de estrongiloidiasis para un diagnóstico oportuno. Además, uno de los sujetos se encontraba asintomático al momento del diagnóstico de estrongiloidiasis. Esto también resalta la importancia de realizar evaluaciones constantes para descartar infección por *Strongyloides stercoralis* en pacientes con HTLV-1, independiente

de los síntomas. En el hemograma de la primera visita (antes de recibir ivermectina), ninguno de los sujetos presentaba eosinofilia (definida como > 500 eosinófilos por microlitro). Dicho hallazgo es destacable debido a que el diagnóstico de estrongiloidiasis podría pasarse por alto si se considera la presencia de eosinofilia como el único criterio de infección parasitaria. Sin embargo, la ausencia de eosinofilia no descarta el diagnóstico de estrongiloidiasis en pacientes con HTLV-1. Esto es explicado por la supresión de la respuesta inmune Th2 en pacientes coinfectados con HTLV-1 y *Strongyloides stecoralis* (11, 24). Dicha respuesta inmune es la encargada de producir interleucina 5, citoquina de suma importancia para la proliferación de eosinófilos.

Fortalezas y Limitaciones

Las limitaciones de este estudio piloto incluyen el número limitado de pacientes debido a la coyuntura suscitada durante el mismo (pandemia del COVID-19). Adicionalmente, un seguimiento a corto plazo (meses) como es el caso de este estudio tiene poca probabilidad de encontrar resultados significativos, ya que el periodo de latencia para el desarrollo de ATLL suele ser de varios años (5). A la fecha aún está pendiente el resultado de la carga proviral de HTLV-1 en los sujetos del estudio, relevante para correlacionar con el riesgo de desarrollo futuro de ATLL y respuesta al tratamiento. Lo anterior es remarcado por Wolf et al (25), quienes utilizaron un método por citometría de flujo que correlacionaba mejor con la carga proviral comparado con la expresión de CADM1 y CD7, sugiriendo que la menor expresión de CD7 no necesariamente correlacionaría con el riesgo de desarrollar ATLL. La dosis de las 24h de ivermectina no era directamente observada por el

personal de salud. Si bien se le indicaba al sujeto cómo debía de tomarla, podría haber ocurrido una falla en la administración del mismo. No se midieron los niveles séricos de ivermectina, si bien esto no parece haber afectado la efectividad del tratamiento en los sujetos del estudio, en pacientes con estrongiloidiasis diseminada el edema de mucosa intestinal podría limitar la absorción del medicamento, aumentando el riesgo de falla al tratamiento (26). El estudio solo contó con sujetos sin estrongiloidiasis severa o diseminada, la cual es la que más se ha asociado al aumento de riesgo de ATLL futuro (8).

Las fortalezas del estudio incluyen ser el primer estudio piloto que describe los cambios en la expresión de CADM1 y CD7 pre y post tratamiento antiparasitario en pacientes coinfectados con HTLV-1 y *Strongyloides stercoralis*. Esto abre una puerta para el desarrollo de futuros estudios más grandes y duraderos. Además, para la realización del estudio se elaboró un protocolo de separación de células mononucleares de sangre periférica y tinción por citometría de flujo, así como de criopreservación y descriopreservación. Esto permitirá que futuros estudios utilicen la misma técnica y reactivos al momento de analizar las muestras de los pacientes, logrando así una uniformización en la adquisición de resultados. Si bien la pandemia limitó el análisis por citometría de flujo de muchos de los pacientes, las muestras han sido criopreservadas y serán analizadas en un corto plazo por los mismos autores de este estudio, en cooperación con más investigadores del IMT-UCPH. La información recaudada permite generar nuevas preguntas a la línea de investigación que se viene realizando desde hace varios años en el IMT-UPCH.

VI. CONCLUSIONES

CADM1 y CD7 parecen ser marcadores útiles para evaluar las poblaciones celulares en pacientes con HTLV-1 coinfectados con *Strongyloides stercoralis*. En este estudio piloto, en pacientes coinfectados con HTLV-1 y estrongiloidiasis no severa, observamos una tendencia a la disminución en la proporción de linfocitos T CD4 CADM1+/CD7- tras iniciar tratamiento antiparasitario. Aunque se requiere ampliar el estudio a formas severas de estrongiloidiasis, este hallazgo no sugiere la expansión monoclonal inmediata que podría incrementar el riesgo de ATLL. Este estudio piloto sienta las bases para sustentar la realización de futuros estudios que investiguen a profundidad las variables mencionadas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Verdonck K, González E, Van Dooren S, Vandamme AM, Vanham G, Gotuzzo E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(4):266-281.
2. Percher F, Jeannin P, Martin-Latil S, et al. Mother-to-Child Transmission of HTLV-1 Epidemiological Aspects, Mechanisms and Determinants of Mother-to-Child Transmission. *Viruses.* 2016;8(2):40.
3. Bangham CR, Ratner L. How does HTLV-1 cause adult T-cell leukaemia/lymphoma (ATL)?. *Curr Opin Virol.* 2015;14:93-100.
4. Matsuoka M, Jeang KT. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ and therapy. *Oncogene.* 2011;30(12):1379-89.
5. Panfil AR, Martinez MP, Ratner L, Green PL. Human T-cell leukemia virus-associated malignancy. *Curr Opin Virol.* 2016;20:40-46.
6. Krolewiecki A, Nutman TB. Strongyloidiasis: A Neglected Tropical Disease. *Infect Dis Clin North Am.* 2019 Mar;33(1):135-151.
7. Gordon CA, Shield JM, Bradbury RS, et al. HTLV-I and Strongyloides in Australia: The worm lurking beneath. *Adv Parasitol.* 2021;111:119-201.
8. Dykie A, Wijesinghe T, Rabson AB, et al. Human T-cell Leukemia Virus Type 1 and Strongyloides stercoralis: Partners in Pathogenesis. *Pathogens.* 2020;9(11):904.
9. Montes M, Sawhney C, Barros N. Strongyloides stercoralis: there but not seen. *Curr Opin Infect Dis.* 2010;23(5):500-4.

10. Keiser PB, Nutman TB. Strongyloides stercoralis in the Immunocompromised Population. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(1):208-17.
11. Montes M, Sanchez C, Verdonck K, et al. Regulatory T cell expansion in HTLV-1 and strongyloidiasis co-infection is associated with reduced IL-5 responses to Strongyloides stercoralis antigen. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(6):e456.
12. Ye, L., Taylor, G. P., & Rosadas, C. Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 and Strongyloides stercoralis Co-infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in medicine.* 2022; 9, 832430.
13. Montes M, Sanchez C, Lewis DE, et al. Normalization of FoxP3(+) regulatory T cells in response to effective antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2011;203(4):496-499.
14. Plumelle Y, Gonin C, Edouard A, et al. Effect of Strongyloides stercoralis infection and eosinophilia on age at onset and prognosis of adult T-cell leukemia. *Am J Clin Pathol.* 1997;107(1):81-87.
15. Michaëlsson J, Barbosa HM, Jordan KA, et al. The frequency of CD127^{low} expressing CD4⁺CD25^{high} T regulatory cells is inversely correlated with human T lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) proviral load in HTLV-1-infection and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *BMC Immunol.* 2008;9:41.
16. Nakahata S, Morishita K. CADM1/TSLC1 is a novel cell surface marker for adult T-cell leukemia/lymphoma. *J Clin Exp Hematop.* 2012;52(1):17.

17. Nakahata S, Saito Y, Marutsuka K, et al. Clinical significance of CADM1/TSLC1/IgSF4 expression in Adult-T cell leukemia/lymphoma (ATLL): identification of various types of ATLL cells. *Retrovirology*. 2011;8(Suppl 1):A49.
18. Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, et al. The CD3 versus CD7 plot in multicolor flow cytometry reflects progression of disease stage in patients infected with HTLV-I. *PLoS One*. 2013;8(1):e53728.
19. Terashima A, Alvarez H, Tello R, Infante R, Freedman DO, Gotuzzo E. Treatment failure in intestinal strongyloidiasis: an indicator of HTLV-I infection. *Int J Infect Dis*. 2002;6(1):28-30.
20. Buonfrate, D., Salas-Coronas, J., Muñoz, J., Maruri, B. T., Rodari, P., Castelli, F., Zammarchi, L., et. al. Multiple-dose versus single-dose ivermectin for *Strongyloides stercoralis* infection (Strong Treat 1 to 4): a multicentre, open-label, phase 3, randomised controlled superiority trial. *The Lancet. Infectious diseases*, 2019. 19(11), 1181–1190.
21. Makiyama, J., Kobayashi, S., Watanabe, E., Ishigaki, T., Kawamata, T., Nakashima, M., Yamagishi, M., Nakano, K., Tojo, A., Watanabe, T., & Uchimaru, K.. CD4+ CADM1+ cell percentage predicts disease progression in HTLV-1 carriers and indolent adult T-cell leukemia/lymphoma. 2019. *Cancer science*, 110(12), 3746–3753.
22. Nutman TB. Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. *Parasitology*. 2017 Mar;144(3):263-273.

23. Rampur L, Jariwala SP, Hudes G, Rosenstreich DL, de Vos G. Effect of ivermectin on allergy-type manifestations in occult strongyloidiasis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016 Oct;117(4):423-428.
24. Springer LE, Patton JB, Zhan T, Rabson AB, Lin HC, Manser T, Lok JB, Hess JA, Abraham D. *Strongyloides stercoralis* and HTLV-1 coinfection in CD34+ cord blood stem cell humanized mice: Alteration of cytokine responses and enhancement of larval growth. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021 Jul 27;15(7):e0009559.
25. Wolf SN, Haddow J, Greiller C, Taylor GP, Cook LBM, Rowan AG. Quantification of T cell clonality in human T cell leukaemia virus type-1 carriers can detect the development of adult T cell leukaemia early. *Blood Cancer J.* 2021 Mar 26;11(3):66.
26. Hennessey DC, Ballesteros ÓA, Merchán DJ, Guevara FO, Severiche DF. Subcutaneous ivermectin for the treatment of the hyperinfection syndrome by *Strongyloides stercoralis*. *Biomedica.* 2020 Jun 15;40(2):228-232.

VIII. TABLAS, GRÁFICOS Y FIGURAS

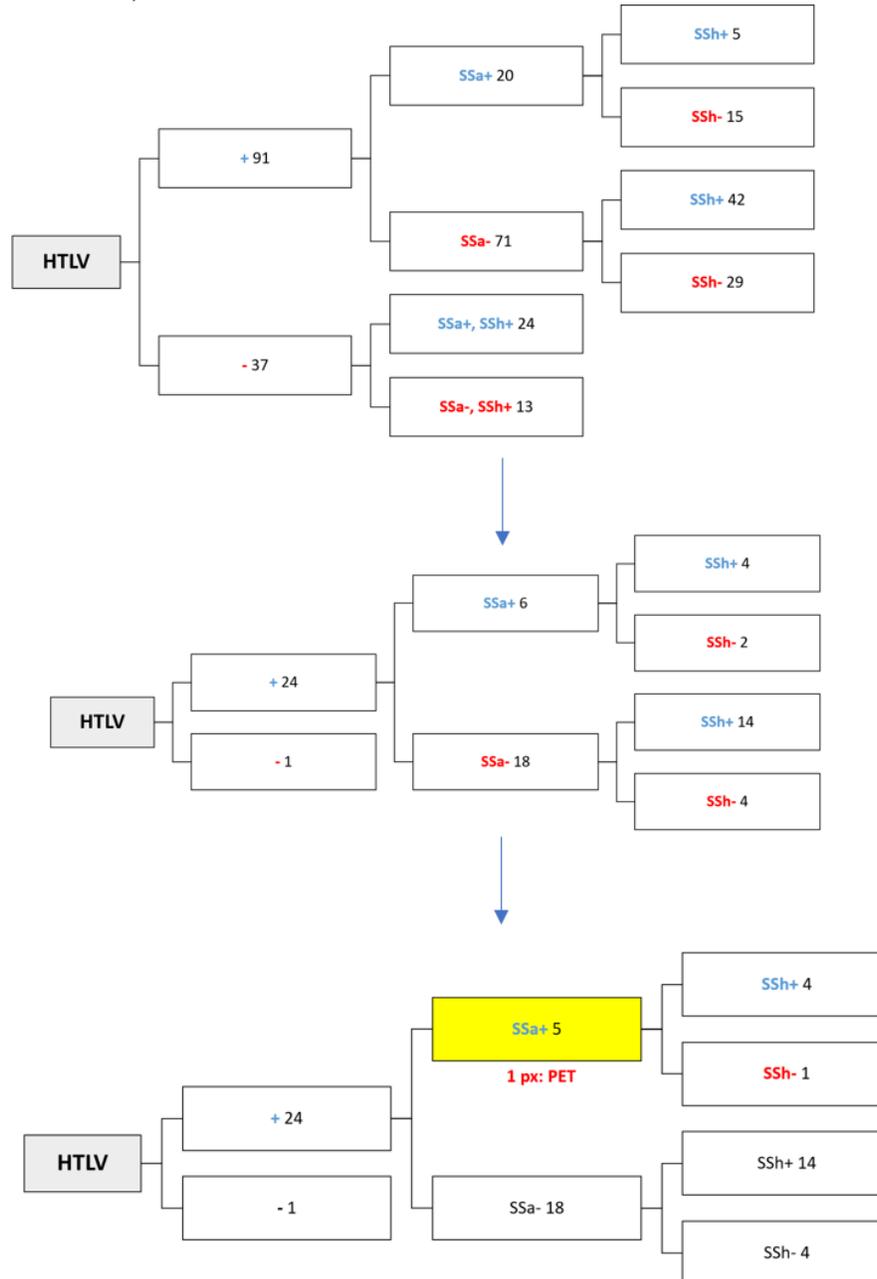


Gráfico 1. Flujo de selección de sujetos del estudio. El total de sujetos en la base de datos al momento de realizar el estudio era de 128, de los cuales 20 tenían diagnóstico de HTLV-1 e infección activa por *Strongyloides stercoralis*. De los 20 sujetos, 6 contaban con análisis de citometría de flujo, de los cuales 1 tenía diagnóstico previo de paraparesia espástica tropical, por lo que fue excluido. SSa+: estrongiloidiasis activa. SSa-: no estrongiloidiasis activa. SSh+: historia de episodio de estrongiloidiasis. SSh-: no historia de estrongiloidiasis. comorbilidades. TDM: trastorno depresivo mayor. PET: paraparesia espástica tropical.

Tabla 1. Datos demográficos de los sujetos del estudio.

	Edad	Sexo	Lugar de Nacimiento	Antecedente estrongiloidiasis	Año antecedente estrongiloidiasis	Año diagnóstico HTLV-1	Comorbilidades
1	49	M	Puno	Sí (1)	2013	2013	Ninguna
2	43	M	Huancayo	No	/	2004	Trastorno depresivo mayor
3	26	M	Ancash	Sí (1)	2018	2018	Anemia resuelta
4	28	F	Ayacucho	Sí (2)	2002, 2014	2014	Ninguna
5	52	M	Lima	Sí (1)	2018	2018	Ninguna

Tabla 2. Motivo de evaluación, síntomas y resultado Baermann en heces.

	Motivo Test estrongiloidiasis	Síntomas al diagnóstico de estrongiloidiasis	Test de Baermann	Cultivo de Agar en Placa
1	Referido por consultorio IMT-UPCH	Epigastralgia. Distensión abdominal. Prurito	> 100 Larvas/gramo	Positivo
2	Control cohorte	Asintomático	10 Larvas/gramo	Positivo
3	Control cohorte	Epigastralgia leve	> 20 Larvas/gramo	Positivo
4	Control cohorte	Dolor abdominal leve	14 Larvas/gramo	Positivo
5	Referido por consultorio IMT-UPCH	Epigastralgia, náuseas.	Negativo	Positivo

Tabla 3. Hemograma previo al inicio del tratamiento antiparasitario (visita 1).

	Hemoglobina (g/dl)	Leucocitos (células/ul)	Linfocitos (células/ul)	Eosinófilos (células/ul)
1	15,2	13 500	2 020	0
2	13,2	6 300	2 330	60
3	13,53	7 200	2 160	290
4	13,2	6 200	1 800	60
5	13,3	8 700	2 610	100
Mediana	13,3	7 200	2 160	60

Tabla 4. Porcentaje del total de linfocitos T CD4 que son CADM1+ y CD7-.

	% Linfocitos T CD4 CADM1+/CD7-		
	Visita 1	Visita 2	Visita 3
1	2,01%	4,10%	4,40%
2	4,50%	10,50%	8,20%
3	4,45%	6,77%	5,76%
4	2,24%	2,84%	1,44%
5	1,89%	0,82%	0,88%
Mediana	2,24%	4,10%	4,40%

Tabla 5. Porcentaje del total de linfocitos T CD4 que son CADM1+.

	% Linfocitos T CD4 CADM1+		
	Visita 1	Visita 2	Visita 3
1	2,95%	6,26%	6,57%
2	8,17%	24%	20,2%
3	13,28%	18,97%	14,94%
4	6,92%	8,62%	4,77%
5	4,98%	4,59%	3,78%
Mediana	6,92%	8,62%	6,57%

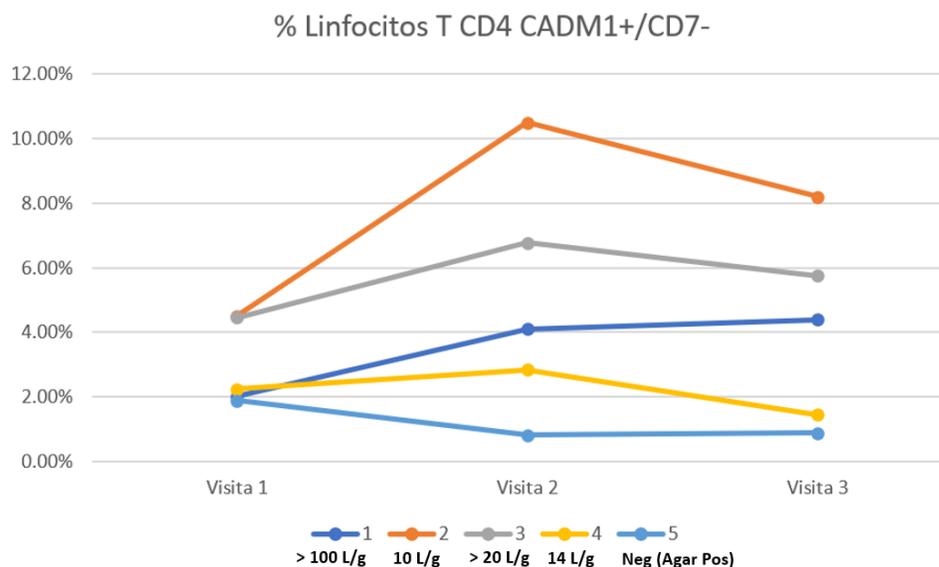


Gráfico 2. Tendencias del porcentaje de linfocitos T CADM1+/CD7- según cada visita. Aumento con una mediana de 1.79% entre la visita 1 y 2 ($p = 0,22$; Wilcoxon). Tendencia a estabilización o reducción entre la visita 2 y 3 (variación mediana 0.5%, $p = 0,26$; Wilcoxon). No variación significativa entre las visitas 1 a 3 ($p > 0,05$, Kruskal-Wallis). L/g: larvas por gramo.

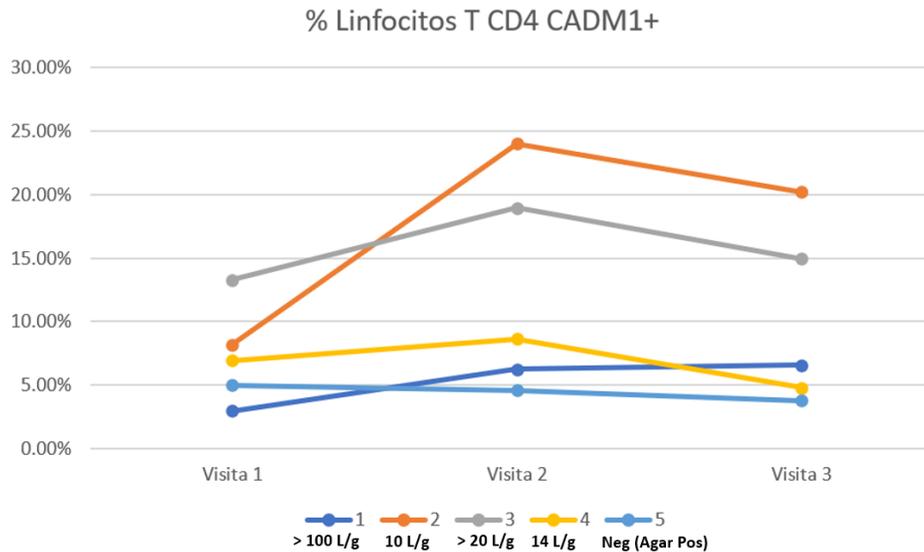


Gráfico 3. Tendencias del porcentaje de linfocitos T CADM1+ según cada visita. No variación significativa entre las visitas 1 a 3 ($p > 0,05$, Kruskal-Wallis). Tendencia similar entre la visitas 1-2 y visitas 2-3 comparado con la población de linfocitos T CADM1+/CD7-. L/g: larvas por gramo.

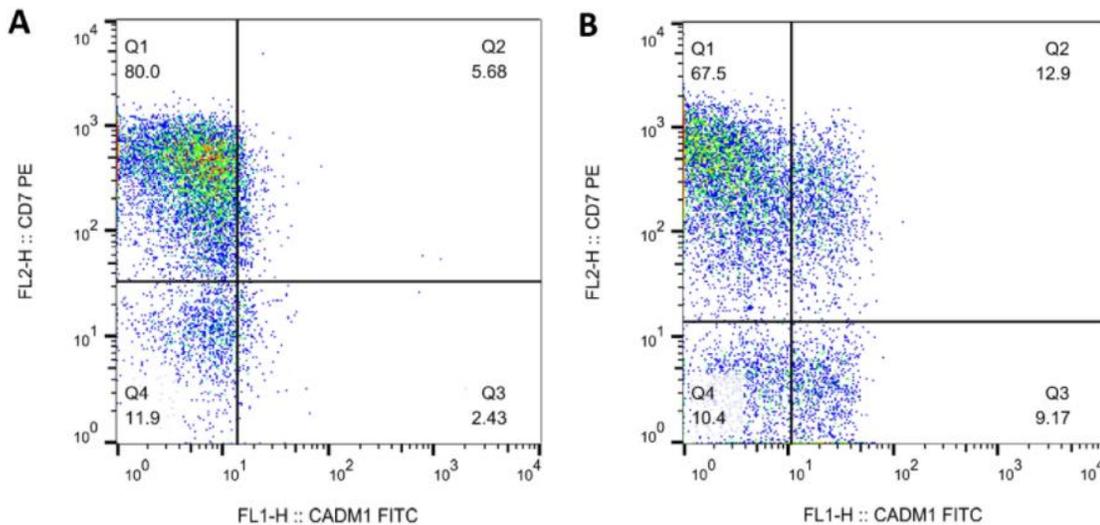


Imagen 1. Gráfico muestra la expresión de CADM1 vs CD7 en la población de linfocitos T CD4+ aislados de sangre periférica en dos sujetos:

A: sujeto con HTLV-1 sin infección activa ni antecedente de estrongiloidiasis. Porcentaje de CADM1+ de 8,11% y de CADM1+/CD7- de 2,43%.

B: sujeto con HTLV-1 e infección actual por estrongiloidiasis (previo al tratamiento antiparasitario). Porcentaje de CADM1+ de 22,07% y de CADM1+/CD7- de 9,17%.

IX. ANEXOS

Protocolo separación células mononucleares de sangre periférica (PBMCs):

1. **Antes de iniciar** alicuotar 1ml de sangre (whole blood) en un tubo de citometría **rotulado**, cerrarlo, y colocarlo en el **rotor** (esta sangre se va a usar para conteo de CD4 y para la lámina periférica).
2. Descongelar el FBS a T° ambiente.
3. Asegurarse que hay un Mr. Frosty vacío en la nevera.
4. Pasar la sangre (20ml) de los tubos de EDTA a un Falcon de 50ml.
5. Añadir al Falcon RPMI incompleto (1:1) en un volumen igual al de la sangre.
6. En otro Falcon de 50 colocar 10ml de Ficoll.
7. Pasar cuidadosamente la sangre diluida al Falcon con Ficoll con una pipeta serológica de 10mL.
8. Centrifugar en programa C Eppendorf (1800rpm, 30min, aceleración 6, brake 0)
9. Extraer los PBMCs (buffy coat) con una pipeta Pasteur y colocarlos en un Falcon de **15ml**.
10. Completar el Falcon hasta 12ml con RPMI incompleto.
11. Centrifugar en programa B Eppendorf (1200rpm, 5min, aceleración 5, brake 0)
12. Decantar el sobrenadante, resuspender (vortexear) y contar en 1 o 2 cuadrantes la concentración de células con azul de tripán (**1:10**). Medir el volumen del pellet y luego calcular el número absoluto de células.
13. Calcular el volumen que contiene a **1 millón de células** y alicuotarlo en un tubo de citometría (rotularlo). Estas células se van a usar para la tinción superficial.
14. **Luego** de realizar el paso anterior, completar con RPMI incompleto hasta 10-12ml el **Falcon de 15ml** que tiene las células.
15. Centrifugar el Falcon de 15 a T° ambiente por 15min a 500g.

Mientras está centrifugando (criopreservación):

1. Si el FBS ya se descongeló, colocarlo en la refrigeradora (4°C).
2. **Preparar la solución criopreservante:**
 - a. Calcular el número de crioviales a usar (cada criovial debe tener 5 a 10 millones de células).
 - b. Cada criovial va a tener 500ul de solución criopreservante.
 - c. Calcular el volumen total de solución criopreservante (**VSC**) que se va a usar (i.e. 500ul x N°crioviales).
 - d. La solución criopreservante es una mezcla de **1:4 de DMSO y RPMI incompleto**.
 - e. En un tubo de citometría (si VSC<5ml, sino usar Falcon de 15) colocar el volumen de **RPMI incompleto** calculado (i.e. **0.8 x VSC**). Luego colocar el **volumen de DMSO** calculado (i.e. **0.2 x VSC**) y vortexear.
 - f. Congelar (en nevera) la solución criopreservante preparada.
3. Preparar el ambiente de trabajo para cuando termine de centrifugar:
 - a. Rotular los crioviales con un post-it y pegarlo bien con scotch. Usar el siguiente formato:
 - PBMC's. SSxx (ej. si es el primer paciente estudiado colocar SS01). N° células. Fecha.
 - No olvidar apuntar en el cuaderno a qué código de la cohorte corresponde el paciente SSxx.
 - b. En un rack de viales colocar "escarcha" de hielo (raspando las paredes de una congeladora del criobanco) y luego guardarlo en la nevera (4°C).

Protocolo tinción de PBMCs con anticuerpos y criopreservación

1. Extraer sangre (3 tubos, aproximadamente 13mL de sangre)
2. Añadir la sangre en un Falcon de 50mL.
3. Diluir con PBS (1:1)
 - a. Se debe tener PBS alicuotado en un tubo aparte, no extraer directamente del frasco.
4. En otro Falcon colocar 10mL de Ficoll.
5. Pasar la sangre diluida al Falcon con Ficoll con una pipeta de 10mL cuidadosamente.
6. Centrifugar programa C Eppendorf (1800rpm, 30min, aceleración 6, brake 0)
7. Extraer los PBMCs (buffy coat) con una pipeta Pasteur y colocarlos en un nuevo Falcon de 50.
8. Añadir PBS al tubo con PBMCs hasta completar 30mL.
9. Centrifugar programa B Eppendorf (1200rpm, 5min, aceleración 5, brake 0)
10. Decantar y lavar con 10ml de PBS (Programa B).
11. Decantar y Vortexear hasta que esté homogéneo.
12. En un tubo para microcentrífuga colocar 90ul de Azul de Tripán y 10ul del Pellet. Vortexear.
13. Colocar 10ul de la mezcla en la cámara de Neubauer.
14. Contar en 1 cuadrante el número de células.
15. Calcular número de células por ml (N°células*10⁵).
16. Calcular, usando una micropipeta, el volumen de Pellet que se obtuvo.
17. Diluir el Pellet a 20x10⁶ células/ml.
18. Calcular el volumen que contenga 10⁶ células (en una dilución de 20x10⁶ células/ml es de 50ul)
19. En cada tubo que se va a usar para la Citometría colocar 10ul de los anticuerpos seleccionados.
20. Colocar el volumen calculado de células (50ul). Vortexear.
21. Incubar 20min en oscuridad a temperatura ambiente o 30min en oscuridad en refrigeradora.
22. Lavar los tubos con 2ml de PBS (Programa B).
23. Colocar 500ul de PBS a cada tubo y vortexear.
24. Correr la Citometría.

Mientras está centrifugando (tinción superficial):

1. La alícuota de 1 millón de células separada previamente debe tener un volumen de **50ul** de RPMI incompleto. Si hay menos añadir lo necesario.
2. Añadir 1ul de CADM1 FITC, 5ul de CD7 PE, 10ul de CD4 PercP y 10ul de CD3 APC. Vortexear.
3. Incubar 30min en oscuridad a temperatura ambiente (a los 15min "vortexear" el tubo con la mano).
Estos pasos se hacen luego de haber incubado (30min), por tanto, luego de haber terminado de criopreservar:
4. Añadir 2ml de RPMI incompleto y lavar: programa B Eppendorf (1200rpm, 5min, aceleración 5, brake 0).
5. Decantar el sobrenadante y resuspender en 500ul de RPMI incompleto. Vortexear.
6. Correr la citometría (plantilla pre-guardada) sin realizar ningún tipo de compensación. Guardar el archivo.

Momentos antes que termine de centrifugar:

1. Sacar el rack de viales con la escarcha de hielo, el FBS y la solución criopreservante y llevarlo a la campana.
2. Colocar los crioviales en el rack que tiene escarcha de hielo y destaparlos.

Cuando termina de centrifugar:

1. Decantar y retirar **todo** el sobrenadante ("secarlo" con una micropipeta).
2. Resuspender las células (pasar el tubo rápidamente por los "huequitos" de la campana).
3. Añadir FBS. Se coloca el siguiente volumen de FBS (en microlitros): $500 \times N^{\circ}$ crioviales.
4. Asegurarse que no queden cristales de hielo en la solución criopreservante. De lo contrario esperar unos minutos.
5. Añadir toda la solución criopreservante (con una micropipeta, poco a poco).
6. Con el mismo tip de la micropipeta hacer 2 pasadas de 500ul desde la mezcla anterior a cada criovial (1ml x criovial).
7. Cerrar bien los crioviales, sacar el Mr. Frosty de la nevera y poner los crioviales.
8. Guardar el Mr. Frosty en el criobanco (-70°C).

Al día siguiente trasladar los crioviales del Mr. Frosty al Nitrógeno Líquido. Apuntar en el cuaderno en qué rack del tanque se guardó y en qué espacio del rack se colocó el criovial.